Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart

Versuche zur Instrumenten-Sterilisation: Das Autoklavieren von ölbedeckten Metallflächen und von Teflonschläuchen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ROLF WILFRIED GROSSMANN
aus Grötzingen

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0025

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart

Versuche zur Instrumenten-Sterilisation: Das Autoklavieren von ölbedeckten Metallflächen und von Teflonschläuchen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ROLF WILFRIED GROSSMANN
aus Grötzingen

1985

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. K. Botzenhart
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. Dr. med. dent. R. Schmelzle

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung S.1

2. Literaturstudium S.2

3. Material und Methoden S.7
   3.1 Testkeime S.7
   3.2 Geräte S.8
   3.3 Chemikalien S.10
   3.4 Versuchsablauf S.12
   3.4.1 Sterilisation von V_2A-Stahlflächen, auf denen Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension angetrocknet wurde S.12
   3.4.2 Sterilisation von Teflonschläuchen und Leinenschnurstücken S.16
   3.5 Erstellung der Abtötungskurven S.23

4. Ergebnisse S.24
   4.1 Ergebnisse der Sterilisation von V_2A-Stahlflächen, auf denen Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension angetrocknet wurde S.24
   4.2 Ergebnisse der Sterilisation von Teflonschläuchen und Leinenschnurstücken S.42

5. Diskussion S.54

6. Zusammenfassung S.56

7. Literaturverzeichnis S.58

1. Einleitung und Problemstellung

In vielen Bereichen der Medizin werden heute Instrumente mit sich bewegenden Teilen eingesetzt, die geschmiert werden müssen, um den Materialverschleiß durch Reibung zu reduzieren. Meist erfolgt die Schmierung mit Öl, durch dessen Anwesenheit die Sterilisierbarkeit der Instrumente, insbesondere das Autoklavieren, aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Öls möglicherweise erschwert wird.
Dieses Problem stellt sich bei chirurgischen Bohrmaschinen und zahnärztlichen Winkelstücken.
Beide müssen außerdem gekühlt werden, wozu über dünne Teflonschläuche Wasser an das Bohrinstrument herangeführt wird. Aufgrund des engen Spaltraumes, den die Lichtung der Schläuche darstellt, ergibt sich auch hier die Frage der Sterilisierbarkeit im üblicherweise verwandten Autoklav. Die Wirksamkeit des Sterilisationsvorganges bei diesen Instrumenten wurde mit Teflonschläuchen und nachgeahmten Metalloberflächen untersucht.

2. Literaturstudium

Schon Rodenbeck (1932) wies nach, daß die zur Sterilisation wasserfreier Substanzen benötigten Sterilisationszeiten erheblich länger sind als bei Anwesenheit von Wasser. Er stellte fest, daß die Abtötungszeit für Sporen nicht nur von der Wasserfreiheit der sie umgebenden Substanzen abhängt, sondern auch von der chemischen Konstitution der betreffenden Stoffe. Der Autor untersuchte, wie sich das Zufügen von Wasser zu wasserfreien Substanzen auf die Sterilisationsbedingungen auswirkte. Er kam zu dem Ergebnis, daß durch Wasserzusatz die erforderliche Sterilisationszeit und die Sterilisationstemperatur sinken. Dabei reichte es aus, das Wasser durch Schütteln in dem zu sterilisierenden Stoff zu verteilen. Die Abtötbarkeit der Keime in den - bis auf den künstlichen Wasserzusatz - wasserfreien Stoffen stieg mit dem Wassergehalt. Schon 0,1% Wasserzusatz zu Fett, Öl und Paraffin genügte, um im Autoklaven bei 120 Grad Celsius in 30 Minuten und bei 130 Grad Celsius in 10 Minuten Keimfreiheit in diesen Stoffen zu erzielen.

Konrich (1963) bestätigte die Angaben von Rodenbeck und fügte hinzu, daß Öl, Fett und Paraffin bei 180 Grad Celsius in 20 Minuten oder bei 200 Grad Celsius in fünf Minuten sterilisiert werden können. Er verwies auf die Problematik der Entkeimung von sich drehenden zahnärztlichen Instrumenten, deren Ölung durch die Sterilisation nicht beeinträchtigt werden sollte. Er empfahl eine 4 bis 5minütige Desinfektion im strömenden Dampf, der das Öl nicht beseitigt und die hier in Frage kommenden Erreger abtötet.

Perkins (1969) wies darauf hin, daß Öle einen vernachlässigbaren Gehalt an Wasser enthalten und daß man nicht annehmen kann, daß der Dampf im Autoklav ölige Substanzen durchdringt. Wenn hitzeresistente Keime von Öl umgeben seien, würden diese

beim Autoklavieren wohl auf die Temperatur des sie umgebenden Dampfes erhitzt, welche aber in jedem Falle nicht ausreichen würde, um die Keime in einer realistischen Sterilisierzeit abzutöten. Deshalb empfahl er für ölige Substanzen eine ausreichend lange Sterilisation in trockener Hitze.

Horn, Privora, Weuffen (1973) legten dar, daß die Hitzesterilisation von Fetten und Ölen vor allem deshalb schwierig ist, weil diese Stoffe nur eine geringe Wärmeleitfähigkeit haben. Die vorteilhafteste Sterilisation sei 25 Minuten bei 180 bis 200 Grad Celsius. Doch auch die Sterilisation im Autoklav sei möglich, wenn in dem mit der betreffenden Substanz gefüllten Gefäß mindestens 0,1% Wasser enthalten sei.

Hegna, Kardel K. und Kardel M. (1978) untersuchten die Sterilisationsbedingungen bei ölgeschmierten zahnärztlichen Instrumenten.
Zunächst autoklavierten sie nachgeahmte Instrumentenoberflächen - Metallzylinder von dentalen Handstücken, außerdem Batiststücke - die mit verschiedenen Testkeimen, unter anderem mit Sporen von Bacillus stearothermophilus und Bacillus subtilis, beimpft wurden. Zur Ölbeschichtung der vorher angetrockneten Keime verwandten sie das Intraspray^{R} der Firma KaVo (Kaltenbach & Voigt). Sie fanden, daß bei 134 Grad Celsius und 8 Minuten Autoklavierzeit alle Testkeime abgetötet wurden und somit die Sterilisation erfolgreich war.
Dieselben Autoren autoklavierten Handstücke aus einer zahnärztlichen Praxis, die 1 Jahr nicht mehr benutzt wurden. Die Instrumente waren seit ihrer Anwendung bei Patienten nicht autoklaviert worden. Sie wurden nun 8 Minuten bei 134 Grad Celsius autoklaviert, wobei sich herausstellte, daß einige davon nicht steril waren. Auch bei Instrumenten, die nur 1 Woche nicht in Gebrauch waren und dann unter den gleichen Bedingungen autoklaviert

wurden, konnte nicht in allen Fällen Sterilität erzielt werden. In die Handstücke, die 1 Jahr beziehungsweise 1 Woche nicht benutzt wurden, brachten die Autoren Testkeime ein und ölten danach die Instrumente. In gleicher Art und Weise verfuhren sie mit neuen, noch nicht gebrauchten Handstücken. Sie konnten alle Instrumente erfolgreich autoklavieren.

Halleck, Mizuba, Zimmer und Woodrow (1979) berichteten, wie geölte und nicht geölte mechanische Instrumente mit verschiedenen Autoklaven sterilisiert werden können. Sie setzten sowohl einen Autoklav mit Vorvakuum als auch einen nach dem Gravitationsverfahren arbeitenden Autoklaven ein, um die Instrumente, in die Bacillus stearothermophilus-Sporenträger eingelegt wurden, auf ihre Sterilität zu kontrollieren. Sie fanden, daß die Form und die Masse der Instrumente und das Schmieröl das Eindringen des Dampfes beeinflussen.
Für 10^4 Bacillus stearothermophilus-Sporen auf Indikatorstreifen, die mit Öl (Mobil DTE 25) bedeckt und im Gravitationsautoklav bei 121 Grad Celsius sterilisiert wurden, ergab sich eine Sterilisationszeit von 35 Minuten und ein D-Wert von 5,6. Unter denselben Bedingungen autoklavierte Streifen ohne Ölbedeckung waren nach 15 Minuten steril, was einem D-Wert von 2,5 entspricht. Die Sterilisierzeit für in die Instrumente eingebrachte Sporen lag bei 121 Grad Celsius im Gravitationsautoklav zwischen 40 und 55 Minuten, wobei die geölten Instumente nur wenig längere Sterilisierzeiten erforderten als die nicht geölten. Im Vorvakuumautoklav dagegen lagen die Zeiten der geölten erheblich über denen der nicht geölten Instrumente.
Beim Vergleich der Autoklavtypen ergab sich eine beim Vorvakuumautoklav deutlich kürzere Sterilisierzeit. Die Autoren empfahlen daher für die Sterilisation von mechanischen

Instrumenten einen Autoklav mit Vorvakuumpumpe. Außerdem rieten sie den Herstellern, die Sterilisationsbedingungen für jedes Instrument zu untersuchen, da die Dampfdurchlässigkeit ähnlicher Instrumente durchaus verschieden sei.

Ergebnisse aus dem Literaturstudium

Autoren	Versuchsobjekte	Sterilisations-bedingungen	Abtötungszeiten
Rodenbeck (1932)	Fett, Öl, Paraffin mit 0,1% Wassergehalt	Autoklav (keine Angabe des Typs)	30 Minuten bei 120°C 10 Minuten bei 130°C
Konrich (1963)	Öl, Fett, Paraffin	Heißluftsterilisation	20 Minuten bei 180°C 5 Minuten bei 200°C
Horn, Privora, Weuffen (1973)	Fette und Öle	Heißluftsterilisation	empfehlen 25 Minuten bei 180°C bis 200°C
Hegna, Kardel K. und Kardel M. (1978)	Dentale Handstücke mit Intraspray^{R}-Öl	Autoklav (keine Angabe des Typs)	8 Minuten bei 134°C
Halleck, Mizuba, Zimmer, Woodrow (1979)	Indikatorstreifen mit Mobil DTE 25-Öl; Mechanische Instrumente mit Mobil DTE 25-Öl	Gravitationsautoklav	35 Minuten bei 121°C 40 bis 55 Minuten bei 121°C

3. Material und Methoden

3.1 Testkeime

Als Testkeime dienten die besonders hitzeresistenten Sporen von Bacillus stearothermophilus und Bacillus subtilis.

Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension (Merck, Darmstadt)

Die wässrige Sporensuspension war auf einen Gehalt von 100 Millionen Sporen pro Milliliter eingestellt. Die Aufbewahrung erfolgte stets im Kühlschrank bei plus vier bis plus sechs Grad Celsius.

Bacillus subtilis-Sporensuspension

Als weiterer Testkeim diente Bacillus subtilis variato globigii. Die Suspension wurde folgendermaßen hergestellt: Von einer in 24 Stunden gezüchteten Traubenzuckerbouillonkultur wurde Weizengrießagar gleichmäßig beimpft und dann 4 Wochen bei Raumtemperatur gehalten, bis eine Versporung zu etwa 90% eingetreten war.
Die Kultur wurde dann in sterilem, destilliertem Wasser abgeschwemmt, durch Glaswolle filtriert, zentrifugiert und dreimal mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Anschließend wurde das Sediment in steriles Wasser gebracht und mit sterilen Glasperlen 10 Minuten, bei 8 Grad Celsius und 200 Umdrehungen pro Minute, geschüttelt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde das Sediment mit 80%igem Äthanol versetzt, um die vegetativen Zellen zu eliminieren, danach geschüttelt, nach 10 Minuten nochmals zentrifugiert und in sterilem, destilliertem Wasser suspendiert.
Diese Suspension wurde nun 1 Stunde, bei 8 Grad Celsius und 200 Umdrehungen pro Minute, geschüttelt. Danach erfolgte die Keimzählung, einmal mittels einer Neubauer-Zählkammer und einmal durch Beimpfen von Nährböden. Die dafür benutzten Agarplatten wurden 17 Stunden bei 37 Grad be-

brütet und dann ausgezählt.
Die Suspension mit Bacillus subtilis variatio globigii enthielt etwa 5 mal 10^8 Sporen pro Milliliter Lösung. Diese Gebrauchssuspension wurde stets in einer Glasstopfenflasche mit Glasperlen bei 4 Grad Celsius aufbewahrt und vor Gebrauch eine halbe Stunde, bei 8 Grad Celsius und 200 Umdrehungen pro Minute, geschüttelt.

3.2 Geräte

Autoklav Aesculap 420

Der doppelwandige Autoklav arbeitet nach dem Gravitationsverfahren, bei dem der Dampf durch den Doppelmantel gezwungen wird, die Sterilisierkammer von oben nach unten zu durchdringen und dadurch die gegenüber dem Dampf erheblich leichtere Luft, über die unten aus der Kammer herausgeführte Strömungsleitung, auszutreiben.
Die Entlüftung erfolgte bei 100 Grad Celsius für jeweils 5 Minuten. Dann wurde das Strömungsventil geschlossen. Die nun folgende Steigezeit war beendet, als die Temperatur auf dem Thermometer 121 Grad Celsius erreichte und das Manometer einen Dampfdruck von 1,1 atü anzeigte. Darauf folgte die eigentliche Sterilisierzeit.

Temperatur-Zeit-Schreiber (Polycomb 2, Hartmann & Braun)

Der elektronische Kompensations-Punktschreiber wurde zusammen mit dem Autoklav Aesculap 420 benutzt.
Die Temperaturwerte von 6 Meßfühlern, die an verschiedenen Stellen der Sterilisierkammer installiert sind, werden in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet, so daß der Temperaturverlauf bis zur Sterilisierzeit überwacht werden kann. Weiterhin kann kontrolliert werden, ob in allen Teilen des Sterilisierraumes die Temperatur beim Autoklavieren 121 Grad Celsius beträgt.

Autoklav Optimat (Stiefenhofer, München)

Bei diesem Autoklav wird vor dem Sterilisiervorgang ein Vakuum im Sterilisierraum erzeugt, so daß den Sterilisationserfolg beeinträchtigende Restluftmengen ausgeschlossen werden. Dadurch erfolgt eine sehr sichere und durch den Wegfall der Ausgleichszeit schnelle Sterilisation.
Die elektrische Vakuumpumpe erzeugt nach dem Beschicken des Autoklaven mit dem Sterilisiergut ein Vakuum von minus 0,91 bar bzw. 0,93 at. Danach erfolgt der Dampfeinstrom, bis der Druck 1 atü und die Temperatur 120 Grad Celsius erreicht. Von diesem Moment an rechnet die Sterilisierzeit. Nach Abschluß dieser Zeit wird das Sterilisiergut getrocknet.

Inkubations-Schüttelschrank (KF-4, Infors, Bottmingen)

Der Schrank ermöglicht Rundschüttelbewegungen von 40 bis 400 Umdrehungen pro Minute. Der einstellbare Temperaturbereich bei einer Raumtemperatur von 25 Grad Celsius beträgt plus 5 Grad Celsius bis 60 Grad Celsius. Es erfolgt ein gleichmäßiges Ausschütteln des Untersuchungsmaterials in dem jeweiligen Spülmittel bei konstanter Temperatur.

Sterilbank (Ceag Schirp, Selm-Bork)

Die Werkbank, die nach dem Laminar Air Flow-System arbeitet, ermöglicht ein keimarmes Arbeiten. Alle Untersuchungen wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um eine Kontamination des Untersuchungsmaterials zu vermeiden.

Membranfilter und Membranfiltergefäße

Es wurden einzeln verpackte, sterile Membranfilter benutzt (Schleicher und Schüll, BA 85/20, Porengröße 0,45 Mikrometer, Durchmesser 50 Millimeter, Celluloseacetat).
Die Membranfiltergefäße (Sartorius SM 16511) ermöglichten die Filtrierung der Spülflüssigkeit, mit der die Versuchsobjekte gespült wurden. Die Filterapparatur wurde vor Ge-

brauch sterilisiert. Die Membranfilter wurden den Gefäßen mit der Pinzette entnommen und auf Nährböden blasenfrei aufgelegt. Während der Bebrütung diffundieren die Nährstoffe aus dem Nährmedium durch den Filter. Es bilden sich auf dem Filter typische Kolonien aus, die dann ausgezählt werden können.

Teller und Plättchen aus V_2A-Stahl

Als Modell für die Metalloberflächen an chirurgischen Bohrmaschinen und zahnärztlichen Winkelstücken dienten Teller und Plättchen aus V_2A-Stahl. Die Metallteller haben einen Gesamtdurchmesser von 20 Millimeter. Der lichte Durchmesser beträgt 18 Millimeter. Der Tellerrand ist einen Millimeter hoch.
Die Metallplättchen sind 30 Millimeter lang, 20 Millimeter breit und 1,5 Millimeter dick.

Teflonschläuche und Leinenschnur

Die transparenten Schläuche aus Teflon, die an den chirurgischen und dentalen Instrumenten angebracht sind, wurden in 150 Millimeter lange Stücke geschnitten. Ihr Gesamtdurchmesser beträgt zwei Millimeter und der lichte Durchmesser einen Millimeter.
Die Schnurstücke aus Leinen, die zum Vergleich mit den Schläuchen benutzt wurden, sind ebenfalls 150 Millimeter lang und haben einen Durchmesser von zwei Millimeter.

3.3 Chemikalien

Aesculap Spezialöl GA 59 (Aesculap-Werke, Tuttlingen)

Für Druckluftmotoren und sämtliche Gleitlager an Chirurgiemotoren und deren Zubehör wird dieses niedrig visköse Öl angewandt. Die Applikation erfolgt in praxi vor der Sterilisation.

Paraffinöl (Merck, Darmstadt, 7160 Paraffin dickflüssig)

Das Paraffinöl ist höher viskös als das Spezialöl GA 59.

Tween 80 (Merck-Schuchart, Darmstadt)

Es handelt sich dabei um ein nicht ionogenes Detergens (Polyoxyethylensorbitanmonooleat).

Nährböden

Für die Untersuchungen mit Bacillus stearothermophilus wurden Blutagarplatten (5% Schafblut in Columbia-Agar-Grundsubstrat), mit Bacillus subtilis Müller-Hinton-Agarplatten verwandt.

Nährlösung

Für die Versuche mit Bacillus stearothermophilus-Sporen-Suspension wurde Gambro-Nährlösung verwandt, während die Bacillus subtilis-Sporen mit Soja-Nährlösung versetzt wurden.

Die Gambro-Nährlösung hat folgende Zusammensetzung:

Difco Bacto-Tryptone	5,0 g
Yeast-Extrakt	3,0 g
$Na_2 HPO_4 \times 2 H_2O$	2,0 g
Aqua dest.	1000 ml
Bromthymol 0,2%ig in wässrig alkoholischer Lösung	12 ml

das Ganze wird autoklaviert
dann wird dem autoklavierten Nährboden
5 g Glucose zugegeben
endgültiger pH-Wert = 7,65

3.4 Versuchsablauf

3.4.1 Sterilisation von V_2A-Stahlflächen, auf denen Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension angetrocknet wurde

Es wird im allgemeinen davon ausgegangen, daß trockene Keime thermisch schwerer abzutöten sind als feuchte. Deshalb wurde Sporensuspension, unter sterilen Kautelen, auf den Metalloberflächen angetrocknet. Außerdem entspricht dies den praktischen Bedingungen, da es häufig zum Antrocknen von Keimen auf Instrumenten kommt.
Es wurde die Schutzwirkung von zwei Ölarten für die Sporen geprüft. Ein gebräuchliches niedrig visköses Schmieröl (Aesculap Spezialöl GA 59) und ein höher visköses Paraffinöl (Merck, Paraffin dickflüssig) wurden untersucht, um den Einfluß der Viskosität von Ölfilmen auf die Sterilisierbarkeit von Instrumenten zu klären.
Außerdem stellte sich die Frage, ob die Schichtdicke des Öls von Bedeutung war, weshalb zwei unterschiedliche Schichtdicken verwandt wurden. Um das Öl nach dem Autoklavieren in Aqua dest. zu lösen, wurde diesem ein Detergens (Tween 80) zugesetzt.
Der von angetrockneten Sporen und von Öl bedeckte V_2A-Stahl wurde autoklaviert. Der Ölfilm wurde mit einer 1%igen wässrigen Tween 80-Lösung abgespült und danach auf Nährböden gebracht. Diese wurden bebrütet, wobei die Sporen zu Kolonien auswuchsen, die gezählt wurden.

3.4.1.1 Metallplättchen mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension

Jeweils 100 Mikroliter Sporensuspension wurden auf eine Seite der Metallplättchen aufgebracht und unter der Sterilbank 1 Stunde angetrocknet. Danach wurden fünf Metallplättchen gleich in 100 Milliliter fassende Gefäße mit 10 Milliliter Aqua dest. ohne Tween 80 gelegt. Jeweils fünf weitere wurden verschieden lange im Autoklav Aesculap 420

exponiert und gleichfalls in wassergefüllte Gefäße getaucht. Im Inkubations-Schüttelschrank wurden die Gefäße darauf, bei 8 Grad Celsius und 200 Umdrehungen pro Minute, eine Stunde in Wasser gespült. 100 Mikroliter aus der Spülflüssigkeit wurden auf eine Blutagarplatte pipettiert und gleichmäßig ausgespatelt, wobei aus einem Gefäß jeweils zwei Nährböden beimpft wurden. Die Blutagarplatten wurden 17 Stunden bei 56 Grad Celsius im Brutschrank gehalten. Danach erfolgte das Zählen der Keime auf den Nährböden. Wenn die Keimzahl auf den Nährböden sehr groß war, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, um ein korrektes Zählen der Keime zu gewährleisten. Auch wenn auf den Nährmedien keine Keime mehr gefunden wurden, war es möglich, daß noch Sporen in der Spülflüssigkeit verblieben, da nur zweimal 100 Mikroliter aus jedem Gefäß entnommen und auf Blutagarplatten pipettiert wurden. Aus diesem Grund wurde die Spülflüssigkeit und die Metallplättchen mit 20 ml Gambro-Nährlösung versetzt und 4 Tage bei 56 Grad Celsius bebrütet. Erfolgte ein Farbumschlag von grün nach gelb, so überlebten noch Sporen.
Die folgenden Versuche mit und ohne Öl wurden in gleicher Art und Weise durchgeführt.

3.4.1.2 Metallplättchen und
3.4.1.3 Metallteller mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit Tween 80-Lösung gespült wurden

Um einen möglichen Einfluß von Tween 80, das als Detergens diente, auf die Sporen auszuschließen, wurden fünf Metallplättchen und -teller mit 1%iger Lösung geschüttelt. Jeweils weitere fünf wurden unterschiedlich lange im Autoklav Aesculap 420 autoklaviert und anschließend mit Tween 80-Lösung gespült.

3.4.1.4 Metallplättchen mit dünnem Ölfilm aus Aesculap Spezialöl GA beschichtet

Auf die Metallplättchen mit angetrockneter Sporensuspension wurden 20 Mikroliter Spezialöl GA 59 aufgetropft und gleichmäßig verteilt. Die Schichtdicke betrug also durchschnittlich 0,033 Millimeter. Fünf Metallplättchen wurden gleich ausgeschüttelt. Jeweils fünf weitere wurden unterschiedlich lange sterilisiert und dann mit 1%iger Tween 80-Lösung gespült. Die Sterilisation erfolgte in beiden Autoklav-Typen.

3.4.1.5 Metallteller mit dickem Ölfilm aus Aesculap Spezialöl GA 59 beschichtet

Nach dem Antrocknen der Sporensuspension wurde 40 Mikroliter Spezialöl GA 59 auf die Metallteller getropft und gleichmäßig verteilt. Die mittlere Schichtdicke des Öls betrug dann 0,157 Millimeter. Fünf Teller wurden sofort in beiden Autoklav-Typen sterilisiert.

3.4.1.6 Metallplättchen mit dünnem Ölfilm aus Paraffinöl beschichtet

Die Metallplättchen mit angetrockneter Sporensuspension wurden mit 20 Mikroliter Paraffinöl beschichtet. Die mittlere Schichtdicke betrug somit 0,033 Millimeter. Die weitere Behandlung erfolgte wie für Aesculap Spezialöl GA 59 beschrieben.

3.4.1.7 Metallteller mit dickem Ölfilm aus Paraffinöl beschichtet

40 Mikroliter dickflüssiges Paraffinöl wurde auf die Teller gebracht, so daß ein im Mittel 0,157 Millimeter dicker Ölfilm entstand. Das weitere Vorgehen stimmt mit dem bei Aesculap Spezialöl GA 59 überein.

Versuchsanordnungen mit V_2A-Stahlflächen, auf denen Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension angetrocknet wurde

Versuchsobjekt	Öl	Dicke des Ölfilms	Spüllösung	Autoklav
1. Metallplättchen	ohne Öl		Aqua dest.	Aesculap 420
2. Metallplättchen	ohne Öl		Tween 80-Lösung	Aesculap 420
3. Metallteller	ohne Öl		Tween 80-Lösung	Aesculap 420
4. Metallplättchen	Spezialöl GA 59	0,033 mm	Tween 80- Lösung	Aesculap 420 und Optimat
5. Metallteller	Spezialöl GA 59	0,157 mm	Tween 80-Lösung	Aesculap 420 und Optimat
6. Metallplättchen	Paraffinöl	0,033 mm	Tween 80-Lösung	Aesculap 420 und Optimat
7. Metallteller	Paraffinöl	0,157 mm	Tween 80-Lösung	Aesculap 420 und Optimat

3.4.2 Sterilisation von Teflonschläuchen und Leinenschnurstücken

Beim Arbeiten mit chirurgischen Bohrmaschinen wird über Teflonschläuche herangeführtes Wasser zur Kühlung des Bohrinstruments verwandt. Schläuche mit demselben lichten Durchmesser werden zur Kühlung von zahnärztlichen Winkelstücken verwandt. Die Schläuche müssen nach dem operativen Eingriff beziehungsweise nach dem Einsatz in der zahnärztlichen Praxis sterilisiert werden. Da es sich um Teflonschläuche von nur einem Millimeter lichten Durchmesser handelt, stellte sich die Frage, ob sie durch Autoklavieren keimfrei gemacht werden können. Weiterhin war unklar, ob die Teflonschläuche besser in feuchtem oder trockenem Zustand sterilisiert werden sollten.
Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden die Teflonschläuche mit Sporensuspension von Bacillus stearothermophilus und Bacillus subtilis gefüllt. Die mit Sporensuspension beimpften Schläuche wurden verschlossen, so daß sicher verhindert werden konnte, daß die Suspension beim Autoklavieren einfach auslief. In anderen Teflonschläuchen wurde Sporensuspension angetrocknet, und danach wurden die unverschlossenen Schläuche sterilisiert. Außer der Tatsache, daß Keime in praxi häufig in den Schläuchen antrocknen, war auch zu bedenken, daß die Sporenresistenz allgemein im trockenen Milieu größer ist als unter feuchten Lebensbedingungen.
Als Vergleich zu den Teflonschläuchen wurden Leinenschnurstücke mit Sporensuspension beimpft und gleichfalls im trockenen und feuchten Zustand autoklaviert. Damit wurde geklärt, ob der Teflonschlauch, in den der Dampf nicht oder nur erschwert eindringen kann, ein Schutz für die Sporen dastellt.

3.4.2.1 Teflonschläuche mit Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension gefüllt

100 Mikroliter Sporensuspension wurde mithilfe einer sterilen Spritze mit Kanüle in jeden Teflonschlauch gefüllt. Beidseits der Flüssigkeitssäule im Schlauch verblieb eine Luftsäule von etwa 2 Zentimeter. Der Teflonschlauch wurde nun an beiden Enden verschlossen. Dazu wurde das jeweils äußerste Ende, etwa 0,5 Zentimeter lang, über dem Bunsenbrenner kurze Zeit erhitzt, bis es plastisch war und darauf mit einer heißen Pinzette verschlossen. Die Länge der Flüssigkeitssäule im Schlauch wurde markiert. Je 10 Schläuche wurden unterschiedlich lange im Autoklav Aesculap 420 sterilisiert.
Danach wurde zunächst die Länge der Flüssigkeitssäule im Teflonschlauch überprüft. Wenn sie der markierten Strecke entsprach, wurden die Schläuche an ihrem Ende, etwa 1,5 Zentimeter vom Rand entfernt, mit einem sterilen Skalpell eröffnet. Die autoklavierte Sporensuspension wurde aus den Schläuchen ausgetrieben und direkt auf Blutagarplatten getropft. Nach dem Ausspateln der Suspension auf den Nährböden wurden diese 17 Stunden bei 56 Grad Celsius bebrütet. Die Keime auf den Blutagarplatten wurden ausgezählt. Wenn die Konzentration der Sporensuspension sehr groß war, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, um ein korrektes Zählen der Keime auf den Nährböden zu gewährleisten.

3.4.2.2 Teflonschäuche mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension

100 Mikroliter Sporensuspension wurde mithilfe einer sterilen Spritze mit Kanüle in die Teflonschläuche gefüllt. Die Suspension wurde 7 Tage im unverschlossenen Teflonschlauch angetrocknet, so daß keine Flüssigkeitssäule mehr sichtbar war. 5 Schläuche mit der angetrockneten Sporensuspension

wurden mit jeweils 10 Milliliter destilliertem Wasser gespült, jeweils 5 Milliliter von jedem Schlauchende. Dazu diente eine Spritze mit einer 1 Millimeter Kanüle, die zum Spülen nur etwa 5 Millimeter in den Teflonschlauch eingeführt wurde. Die Spülflüssigkeit wurde direkt in 100 Milliliter fassende Gefäße gefüllt. Die mit 10 Milliliter gefüllten Gefäße wurden eine Stunde, bei 8 Grad Celsius und 200 Umdrehungen pro Minute, geschüttelt. Danach wurden zweimal 100 Mikroliter aus jedem Gefäß auf je eine Blutagarplatte pipettiert, so daß pro Gefäß zwei Nährböden beimpft wurden. Diese Nährböden wurden 17 Stunden bei 56 Grad Celsius bebrütet und anschließend ausgezählt.
Jeweils 5 weitere Teflonschläuche wurden unterschiedlich lange im Autoklav Aesculap 420 sterilisiert. Die 3 und 5 Minuten autoklavierten Schläuche wurden, wie oben beschrieben, gespült, und Nährböden wurden beimpft. Die 10 und 20 Minuten behandelten Schläuche wurden ebenfalls mit 10 Milliliter Aqua dest. gespült und dann geschüttelt. Die Spülflüssigkeit wurde nun durch einen sterilen Membranfilter gegossen, in dem die Sporen hängenblieben, so daß auch die wenigen überlebenden Sporen erfaßt werden konnten. Die Spülgefäße wurden anschließend zweimal mit 10 Milliliter sterilem destilliertem Wasser ausgespült, das gleichfalls durch den Membranfilter gegossen wurde, um damit eventuell an den Gefäßwänden noch haftende Sporen abzuspülen. Dann wurden die Membranfilter direkt auf einen Nährboden gebracht und 17 Stunden bei 56 Grad Celsius bebrütet. Anschließend erfolgte die Keimzählung auf den Nährböden.

3.4.2.3 Leinenschnurstücke mit Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension beimpft

Als Vergleich zu den Teflonschläuchen dienten 15 Zentimeter lange sterilisierte Leinenschnurstücke. Sie wurden auf sterile Objektträger gelegt und mit 100 Mikroliter Sporensuspension aus einer Spritze beimpft. 5 Leinenschnurstücke wurden dann mit den Objektträgern jeweils in ein 100 Milliliter fassendes Gefäß mit 10 Milliliter destilliertem Wasser gebracht und eine Stunde, bei 8 Grad Celsius und 200 Umdrehungen pro Minute, im Inkubations-Schüttelschrank gespült. Zweimal 100 Mikroliter aus jedem Gefäß wurden auf Blutagarplatten pipettiert, so daß pro Gefäß zwei Nährböden beimpft wurden. Die Bebrütung erfolgte 17 Stunden lang bei 56 Grad Celsius. Danach wurden die Keime auf den Nährböden ausgezählt.
Jeweils 5 weitere Schnustücke wurden auf den Objektträgern im Autoklav Aesculap 420 bei 121 Grad Celsius unterschiedlich lange sterilisiert. Danach wurden die Schnurstücke mit den Objektträgern, wie oben beschrieben, in 10 Milliliter ausgeschüttelt, Nährböden mit 100 Mikroliter Spülflüssigkeit beimpft, bebrütet und ausgezählt. Da sich nach 10 Minuten Sterilisierzeit auf den Nährböden kein Wachstum mehr zeigte, wurden die entsprechenden Gefäße mit dem Schnurstück und dem Objektträger mit 20 Milliliter Gambro-Nährlösung versetzt und vier Tage bebrütet. Es sollte geklärt werden, ob das Untersuchungsmaterial völlig keimfrei war, auch wenn auf den Nährböden keine Keime mehr gefunden wurden. Auf diese Art und Weise konnten auch Keime nachgewiesen werden, die eventuell beim Abpipettieren von zweimal 100 Mikroliter nicht erfaßt wurden.

3.4.2.4 Leinenschnurstücke mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension

Die Schnurstücke wurden, wie oben beschrieben, auf sterile Deckgläser gelegt und mit 100 Mikroliter Sporensuspension beimpft. Die Suspension wurde 1 Stunde unter der Sterilbank angetrocknet. 5 Schnüre wurden in 10 Milliliter sterilem destilliertem Wasser 1 Stunde, bei 8 Grad Celsius und 200 Umdrehungen pro Minute, geschüttelt. Aus jedem Spülgefäß wurden zwei Blutagarplatten mit 100 Mikroliter beimpft. Die Nährböden wurden 17 Stunden bei 56 Grad Celsius bebrütet. Anschließend wurden die Keime gezählt.
Weitere Schnurstücke wurden bei 121 Grad Celsius im Autoklav Aesculap 420 sterilisiert. Sie wurden, wie oben beschrieben, geschüttelt, es wurden Nährböden beimpft, die nach dem Bebrüten ausgezählt wurden. Wenn sich auf den Blutagarplatten kein Wachstum von Keimen zeigte, wurde die zugehörige Spülflüssigkeit mit Gambro-Nährlösung versetzt und 4 Tage bei 56 Grad Celsius bebrütet.

3.4.2.5 Teflonschläuche mit Bacillus subtilis-Sporensuspension gefüllt

Das Vorgehen entsprach dem für die Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension (3.4.2.1) beschriebenen Versuchsablauf. Als Nährböden bei den Untersuchungen mit Bacillus subtilis dienten Testagarplatten. Nach dem Ausspateln der Sporensuspension auf den Nährböden, wurden diese 17 Stunden bei 37 Grad Celsius bebrütet. Die Teflonschläuche wurden im Autoklav Aesculap 420 sterilisiert.

3.4.2.6 Teflonschläuche mit angetrockneter Bacillus subtilis-Sporensuspension

Auch diese Versuche wurden analog den unter 3.4.2.2 dargestellten mit Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension durchgeführt. Von der Spülflüssigkeit der 3 Minuten autoklavierten Schläuche wurden 100 Mikroliter auf Testagarplatten pipettiert, während bei den 5 und 10 Minuten sterilisierten Schläuchen die Membranfiltermethode angewandt wurde.

3.4.2.7 Leinenschnurstücke mit Bacillus subtilis-Sporensuspension beimpft

Die Schnurstücke wurden genauso beimpft und sterilisiert wie unter 3.4.2.3 für die Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension beschrieben. Die Gefäße mit den 10 Minuten autoklavierten Schnurstücken wurden mit Soja-Nährlösung versetzt und 4 Tage bei 37 Grad Celsius bebrütet. Danach wurde kontrolliert, ob eine Trübung der Spülflüssigkeit eingetreten war. Damit konnten Keime nachgewiesen werden, die beim Beimpfen der Testagarplatten mit zweimal 100 Mikroliter aus der Spülflüssigkeit nicht erfaßt wurden.

3.4.2.8 Leinenschnurstücke mit angetrockneter Bacillus subtilis-Sporensuspension

Es wurde wie unter 3.4.2.4 für Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension beschrieben vorgegangen. Die Spüllösung der 20 Minuten autoklavierten Schnurstücke wurde mit Soja-Nährlösung versetzt und ebenfals 4 Tage bei 37 Grad Celsius bebrütet.

Versuchsanordnung bei der Sterilisation von Teflonschläuchen und Leinenschnustücken im Autoklav Aesculap 420

Versuchsobjekt	Testkeim	Sporensuspension
1. Teflonschläuche	Bacillus stearothermophilus	nicht angetrocknet
2. Teflonschläuche	Bacillus stearothermophilus	angetrocknet
3. Leinenschnurstücke	Bacillus stearothermophilus	nicht angetrocknet
4. Leinenschnurstücke	Bacillus stearothermophilus	angetrocknet
5. Teflonschläuche	Bacillus subtilis	nicht angetrocknet
6. Teflonschläuche	Bacillus subtilis	angetrocknet
7. Leinenschnurstücke	Bacillus subtilis	nicht angetrocknet
8. Leinenschnurstücke	Bacillus subtilis	angetrocknet

3.5 Erstellung der Abtötungskurven

Die Abtötungskurven geben die Anzahl der überlebenden Sporen in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Ihre Berechnung erfolgte nach der Methode der kleinsten Quadrate, die bei einem linearen Zusammenhang zwischen Zeit und Sporenzahl angewandt werden kann. Da die Abtötungsrate $kt=\ln(\frac{No}{N})$ aber logarithmisch ist, war eine Transformation der Kurve in eine Gerade erforderlich, so daß sich folgende Form ergab: $\ln N=-kt+\ln No$.
N bezeichnet die nach der Sterilisierzeit t noch lebensfähige Sporenzahl. No ist die Anzahl der ursprünglich vorhandenen Sporen, k die Abtötungskonstante. Mittels linearer Regression konnten nun Ausgleichskurven berechnet werden, die dann graphisch dargestellt wurden. In jeder Kurve wurde die Dezimalreduktionszeit (D-Wert) angegeben.

4. Ergebnisse

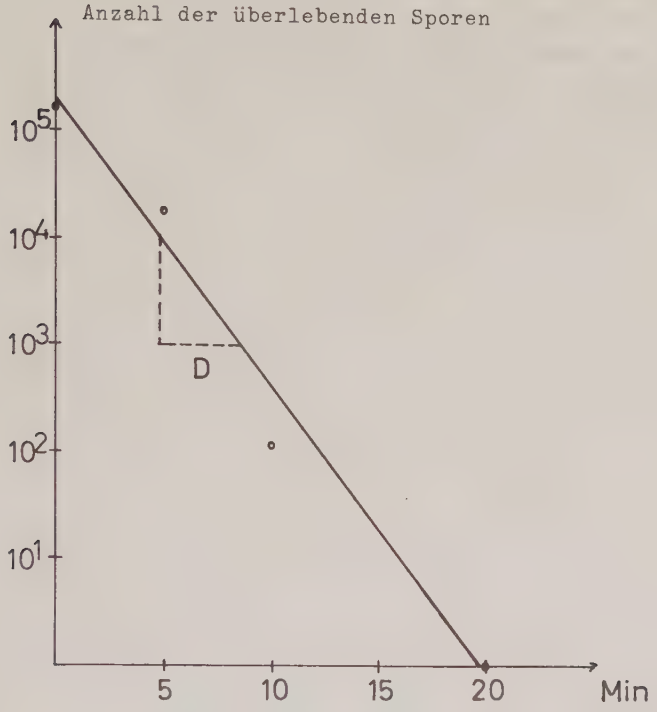
4.1 Sterilisation von V_2A-Stahlflächen, auf denen Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension angetrocknet wurde

Aus dem unterschiedlichen Verlauf der Sterilisation ergaben sich voneinander verschiedene Abtötungskurven mit unterschiedlichen D-Werten und Abtötungszeiten.

4.1.1 Metallplättchen mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit Aqua dest. gespült wurden

Nach 20 Minuten Sterilisierzeit wurden auf den Blutagarplatten keine Keime mehr gefunden.
Nach dem Bebrüten mit Gambro-Nährlösung stellte sich heraus, daß nach dieser Zeit trotzdem noch Sporen überlebten. Erst nach 35 Minuten Sterilisierzeit konnte, auch nach 4tägigem Bebrüten mit Nährlösung, kein Wachstum mehr festgestellt werden. Der D-Wert betrug 3,72 Minuten.
Die Resistenz der verwendeten Bacillus stearothermophilus-Sporen lag somit in dem von Wallhäußer (1978) angegebenen Bereich von 2 bis 4 Minuten Dezimalreduktionszeit, wenn bei 121 Grad Celsius und 1 atü autoklaviert wird.

Abtötungskurve für die Metallplättchen mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit Aqua dest. gespült wurden



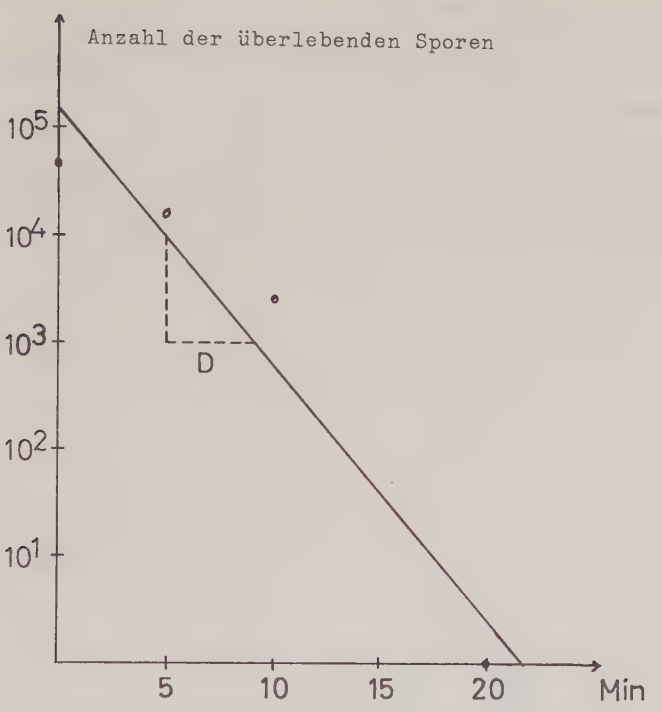
Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420

4.1.2 Metallplättchen mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit Tween 80-Lösung gespült wurden

Auch hier zeigte sich bei den 20 Minuten autoklavierten Metallplättchen auf dem Agar kein Wachstum mehr.

Nach dem Bebrüten mit Gambro-Nährlösung wurden noch überlebende Sporen gefunden. Erst bei 35 Minuten Autoklavierzeit waren sicher alle Sporen abgetötet.
Der D-Wert betrug 4,19 Minuten.

Abtötungskurve für die Metallplättchen mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit Tween 80-Lösung gespült wurden



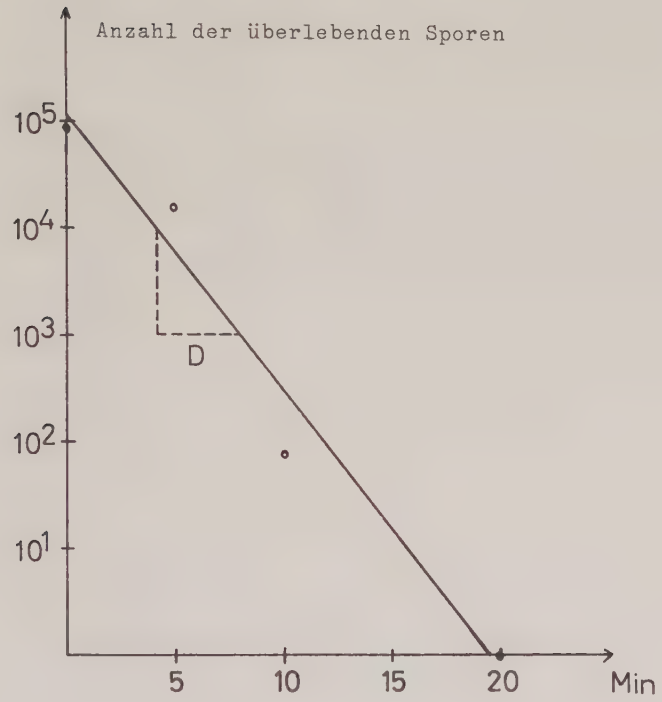
Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420

4.1.3 Metallteller mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit Tween 80-Lösung gespült wurden

Nach 20 Minuten Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420 wiesen die Blutagarplatten kein Sporenwachstum mehr auf.

Erst als die Metallplättchen 35 Minuten autoklaviert wurden, konnten auch nach dem Bebrüten mit Nährlösung keine überlebenden Sporen mehr gefunden werden.
Der D-Wert betrug 3,84 Minuten. Aus dem Vergleich der D-Werte und der Abtötungszeiten der vorstehenden Versuche ergibt sich, daß das Detergens Tween 80 keinen Einfluß auf die Vermehrungsfähigkeit der Sporen hat.

Abtötungskurve für die Metallteller mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit Tween 80-Lösung gespült wurden

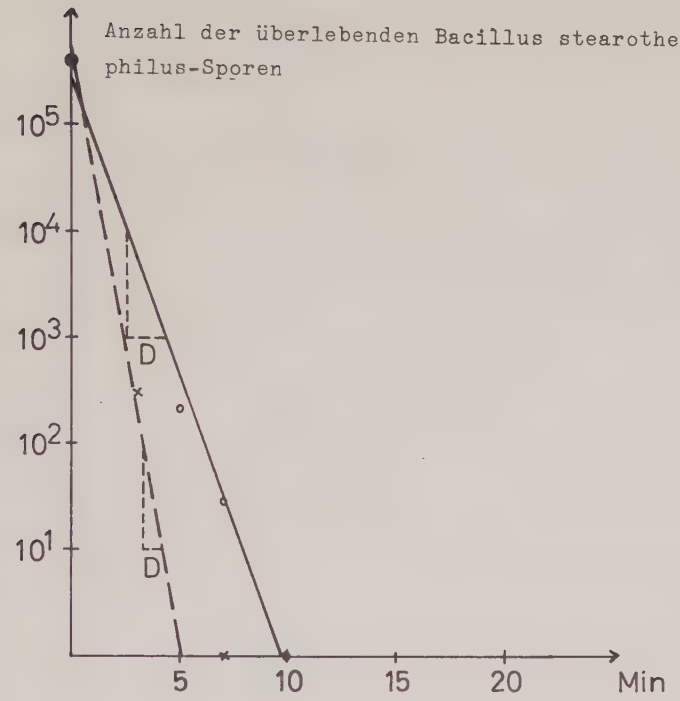


Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420

4.1.4 Metallplättchen mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit einem dünnen Ölfilm aus Aesculap Spezialöl GA 59 beschichtet wurden

Nachdem die Plättchen mit 1%iger Tween 80-Lösung gespült wurden, zeigte sich nach 7 Minuten Sterilisierzeit im Autoklav Optimat und nach 10 Minuten im Autoklav Aesculap 420 kein Wachstum mehr auf den Agarplatten.
Nach dem Bebrüten mit Gambro-Nährlösung konnten nach 30 Minuten Sterilisierzeit im Vorvakuumautoklav und nach 35 Minuten im Autoklav Aesculap 420 keine überlebenden Sporen mehr festgestellt werden.
Die D-Werte betrugen 0,9 Minuten und 1,79 Minuten.

Abtötungskurve für die Metallplättchen mit dünnem Ölfilm aus Aesculap Spezialöl GA 59 beschichtet

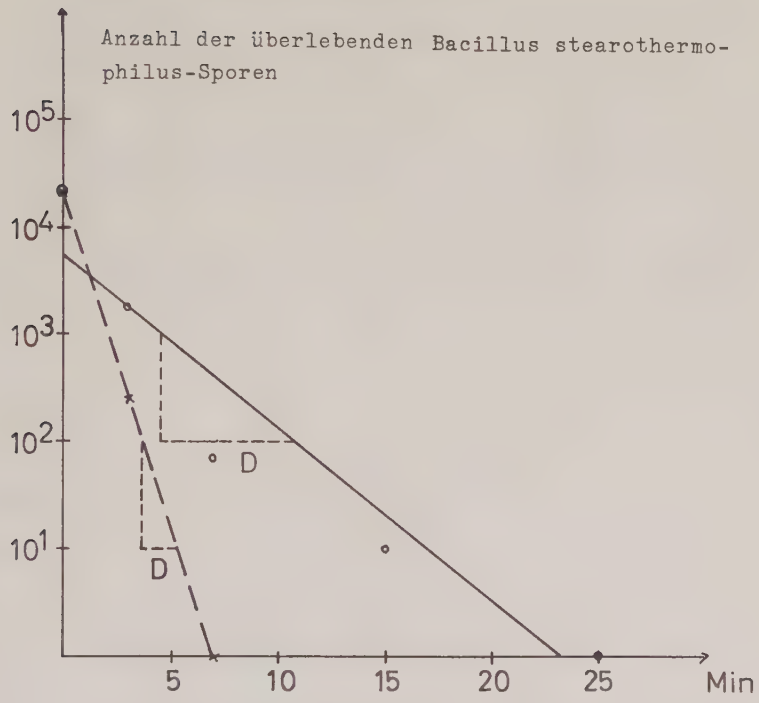


Sterilisierzeit im Autoklav: Aesculap 420 ———
Optimat – – –

4.1.5 Metallteller mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit einem dicken Ölfilm aus Aesculap Spezialöl GA 59 beschichtet wurden

Die Metallteller wurden nach dem Sterilisieren mit 1%iger Tween 80-Lösung gespült. Nach 7 Minuten Sterilisierzeit im Vorvakuumautoklav und nach 25 Minuten im Autoklav Aesculap 420, waren auf den Blutagarplatten keine Keime mehr zu finden.
Nach dem Bebrüten mit Nährlösung fanden sich nach 30 Minuten im Optimat und nach 35 Minuten im Aesculap 420 keine Sporen mehr.
Die D-Werte betrugen 1,61 und 6,22 Minuten.

Abtötungskurve für die Metallteller mit dickem Ölfilm aus Aesculap Spezialöl GA 59 beschichtet

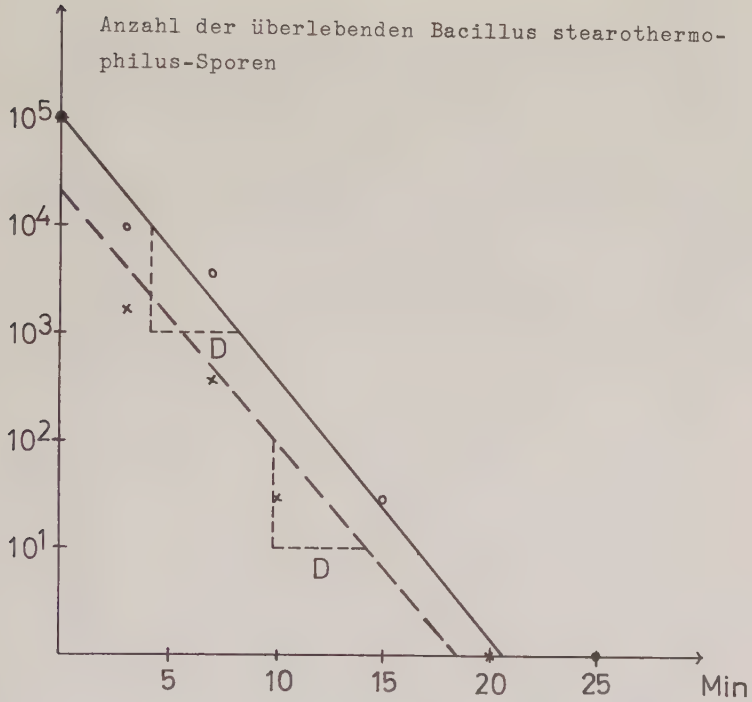


Sterilisierzeit im Autoklav: Aesculap 420 ——
Optimat – – –

4.1.6 Metallplättchen mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit einem dünnen Ölfilm aus Paraffinöl beschichtet wurden

Nachdem die Metallplättchen autoklaviert und mit 1%iger Tween 80-Lösung gespült wurden, zeigte sich nach 20 Minuten Sterilisierzeit im Optimat und nach 25 Minuten im Aesculap 420 kein Wachstum mehr auf dem Agar.
Auch hier fanden sich, nach dem 4tägigen Bebrüten mit Nährlösung, erst nach 30 Minuten im Vorvakuumautoklav und nach 35 Minuten im Aesculap-Autoklav keine Sporen mehr.
Die D-Werte betrugen 4,26 im Vorvakuumautoklav und 4,11 Minuten im Autoklav Aesculap 420.

Abtötungskurve für die Metallplättchen mit dünnem Ölfilm aus Paraffinöl beschichtet

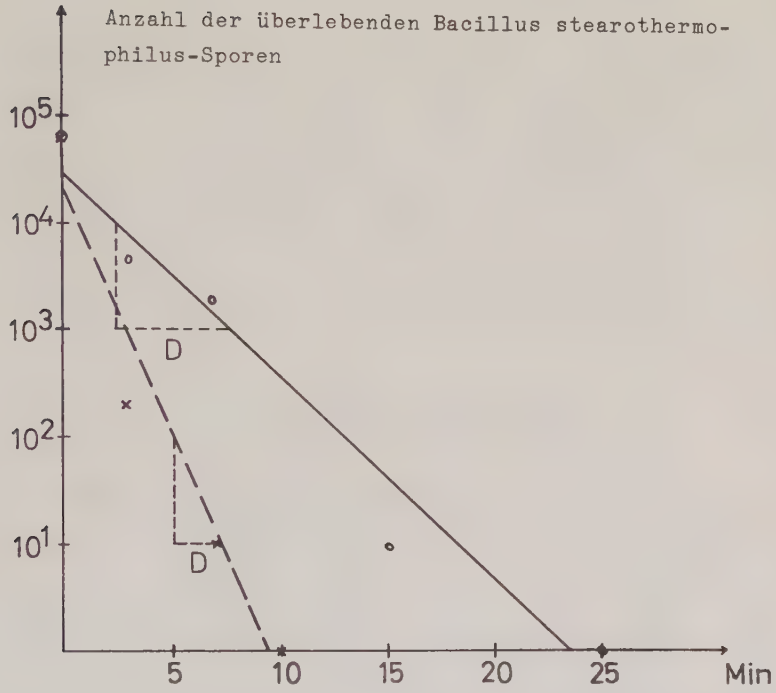


Sterilisierzeit im Autoklav: Aesculap 420 ———
Optimat – – –

4.1.7 Metallteller mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension, die mit einem dicken Ölfilm aus Paraffinöl beschichtet wurden

Die Metallteller wurden ebenfalls mit 1%iger Tween 80-Lösung gespült. Hier wiesen die Blutagarplatten nach 10 Minuten im Vorvakuumautoklav und nach 25 Minuten im Autoklav Aesculap 420 keine Keime mehr auf. Nachdem die Spülflüssigkeit mit Gambro-Nährlösung versetzt wurde, fanden sich nach 30 Minuten Sterilisierzeit im Optimat und nach 35 Minuten im Aesculap 420 keine Sporen mehr.
Die D-Werte betrugen 2,17 und 5,23.

Abtötungskurve für die Metallteller mit dickem Ölfilm aus Paraffinöl beschichtet



Sterilisierzeit im Autoklav: Aesculap 420 ———
Optimat – – –

Ergebnisse der Sterilisation von V_2A-Stahlflächen, auf denen Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension angetrocknet wurde

Versuchsobjekt	Autoklavtyp	Abtötungszeit nach Auszählen des Agars	Abtötungszeit nach Bebrüten mit Nährlösung	D-Wert
Metallplättchen ohne Öl mit Aqua dest. gespült	Aesculap 420	20 Minuten	35 Minuten	3,72
Metallplättchen ohne Öl mit Tween 80 (1%) gespült	Aesculap 420	20 Minuten	35 Minuten	4,19
Metallteller ohne Öl mit Tween 80 (1%) gespült	Aesculap 420	20 Minuten	35 Minuten	3,84
Metallplättchen mit dünnem Ölfilm aus Spezialöl GA 59	Aesculap 420 Optimat	10 Minuten 7 Minuten	35 Minuten 30 Minuten	1,79 0,9
Metallteller mit dickem Ölfilm aus Spezialöl GA 59	Aesculap 420 Optimat	25 Minuten 7 Minuten	35 Minuten 30 Minuten	6,22 1,61
Metallplättchen mit dünnem Ölfilm aus Paraffinöl	Aesculap 420 Optimat	25 Minuten 20 Minuten	35 Minuten 30 Minuten	4,11 4,26
Metallteller mit dickem Ölfilm aus Paraffinöl	Aesculap 420 Optimat	25 Minuten 10 Minuten	35 Minuten 30 Minuten	5,23 2,17

4.1.8 Vergleich der beiden Autoklavtypen

Die D-Werte lagen für den Autoklav Optimat, außer bei den sterilisierten Metallplättchen mit dünnem Ölfilm aus Paraffinöl (3.4.1.6), zwischen 0,89 und 4,61 Minuten unter den Werten des Autoklav Aesculap 420. Der Vorvakuumautoklav war also, mit einer Ausnahme, stets wirksamer in der Keimabtötung als der nach dem Gravitationsverfahren arbeitende Autoklav. Dies zeigten auch die Ergebnisse für die Abtötungszeiten, die sich nach dem Beimpfen des Agars und nach dem Bebrüten der Nährlösung ergaben. Mindestens 3 Minuten früher waren alle Sporen im Autoklav Optimat abgetötet, wenn man die Werte für die Blutagarplatten vergleicht. Nach dem Beimpfen mit Nährlösung, waren stets nach 30 Minuten im Autoklav Optimat und nach 35 Minuten im Autoklav Aesculap 420 keine Sporen mehr nachzuweisen.

4.1.9 Vergleich der Versuche mit Spezialöl GA 59

Die D-Werte und die Abtötungszeiten, die sich nach dem Auszählen der Blutagarplatten ergaben, verdoppelten sich etwa beim dicken Ölfilm gegenüber dem dünnen Ölfilm. Eine größere Schichtdicke des Spezialöls GA 59 wirkte sich also ungünstig auf den Sterilisationsprozeß aus. Vergleicht man die D-Werte der geölten Metallflächen für beide Autoklavtypen mit denjenigen der nicht geölten Metallplättchen und -teller, die ja im Autoklav Aesculap 420 sterilisiert wurden, so zeigt sich nur im Gravitationsautoklav beim dicken Ölfilm ein höherer D-Wert als bei den ungeölten Metallflächen. Auch die Abtötungszeit, die sich nach dem Beimpfen des Agars ergab, war nur hier 5 Minuten länger.
Nach dem Bebrüten mit Gambro-Nährlösung fand sich für die geölten wie die nicht geölten Metallstücke im Autoklav Aesculap 420 die gleiche endgültige Abtötungszeit von 35 Minuten. Im Vorvakuumautoklav war dagegen das geölte V_2A-Metall schon nach 30 Minuten keimfrei.

4.1.10 Vergleich der Versuche mit Paraffinöl

Der D-Wert lag für den dickeren Ölfilm nur im Autoklav Aesculap 420 höher als bei der dünneren Ölbeschichtung, nicht jedoch im Vorvakuumautoklav. Letzteres ist aber wohl auf die von uns ungünstig gewählte Sterilisationszeit von 20 Minuten bei den Versuchen mit dem dünnen Paraffinölfilm zurückzuführen, so daß man auch hier davon ausgehen kann, daß die größere Schichtdicke des Paraffinöls die Sterilisation erschwert.
Vergleicht man die D-Werte der geölten Metallflächen für beide Autoklavtypen mit denjenigen der nicht geölten Metallplättchen und -teller, die im Autoklav Aesculap 420 sterilisiert wurden, so ergibt sich nur im Gravitationsautoklav beim dicken Ölfilm ein höherer D-Wert als bei den ungeölten Metallflächen.

4.1.11 Vergleich der beiden Ölarten

1. Autoklav Optimat

Beim Vorvakuumautoklav lagen die D-Werte für die Versuche mit Paraffinöl bei beiden Öldicken höher als beim Spezialöl GA 59. Die Abtötungszeit, die sich nach dem Beimpfen der Blutagarplatten ergab, verlängerte sich um mindestens 3 Minuten beim Paraffinöl gegenüber dem Spezialöl GA 59. Nach dem Bebrüten mit Nährbouillon ergab sich dagegen immer eine Sterilisationszeit von 30 Minuten.
Die Viskosität des Öls beeinflußte also den Sterilisationsvorgang im Vorvakuumautoklav. Je zähflüssiger das Öl war, desto schwerer waren die Metallflächen zu sterilisieren.

2. Autoklav Aesculap 420

Für den dünnen Ölfilm ergab sich eine Erhöhung des D-Wertes beim Paraffinöl gegenüber dem Spezialöl GA 59. Die Abtötungszeit nach Beimpfen der Blutagarplatten stieg um 15 Minuten beim Paraffinöl im Vergleich zum Spezialöl GA 59.

Nach dem Bebrüten mit Nährbouillon war die Abtötungszeit gleich. Beim dicken Ölfilm lag der D-Wert für das Paraffinöl niedriger als beim Spezialöl GA 59. Die Abtötungszeit war gleich.
Die Viskosität des Öls beeinflußte hier den Sterilisationsvorgang nur bei dünnen Ölfilmen.

Für Autoklaven, die bei 120 Grad Celsius und 1 atü Dampfdruck arbeiten, wird im allgemeinen eine Sterilisierzeit von 30 Minuten empfohlen. Wird die Luft durch das Vorvakuumverfahren beseitigt, reicht diese Zeit aus, um alle Sporen auf den untersuchten ölbedeckten Metallflächen abzutöten, gleichviel welches der beiden Öle angewandt wird und welche der beiden Schichtdicken vorliegt. Für Autoklaven, die nach dem Gravitationsverfahren arbeiten, muß zur Erzielung einer erfolgreichen Sterilisation 35 Minuten autoklaviert werden.

4.2 Die Sterilisation von Teflonschläuchen und Leinenschnurstücken

Da die Versuche alle im Autoklav Aesculap 420 durchgeführt wurden, traten Unterschiede im Verlauf der Abtötungskurven vor allem dadurch auf, daß die Sporen sofort oder erst nach dem Antrocknen dem Sterilisationsvorgang unterzogen wurden.

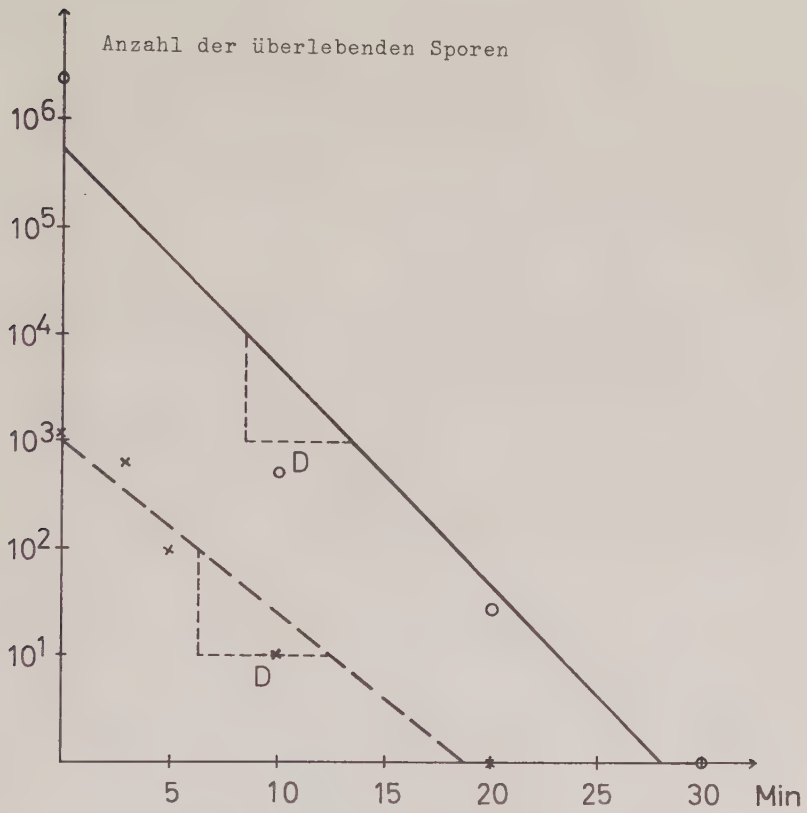
4.2.1 Teflonschläuche mit Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension gefüllt

Nach 30 Minuten Sterilisierzeit, waren keine Keime mehr auf den Blutagarplatten zu finden. Da die Sporensuspension direkt auf den Agar gebracht wurde, entspricht diese Zeit der Abtötungszeit aller Sporen.
Der D-Wert betrug 4,9 Minuten.

4.2.2 Teflonschläuche mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension

Durch die hier angewandte Membranfiltermethode konnten alle überlebenden Sporen auf den Blutagarplatten erfaßt werden. Nach 20 Minuten Sterilisierzeit wurde im Durchschnitt nur noch 1 Keim pro Blutagarplatte gezählt. Da bei den Abtötungskurven der Logarithmus der Keimzahl aufgezeichnet wird, ergibt sich für einen Keim ein Ordinatenwert von 10^{0}. Deshalb entspricht hier die Sterilisation von 10 Minuten der endgültigen Abtötungszeit.
Der D-Wert betrug 6,22 Minuten.

Abtötungskurven für die mit Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension gefüllten Teflonschläuchen



Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420:
——— nicht angetrocknete Sporensuspension
– – – angetrocknete Sporensuspension

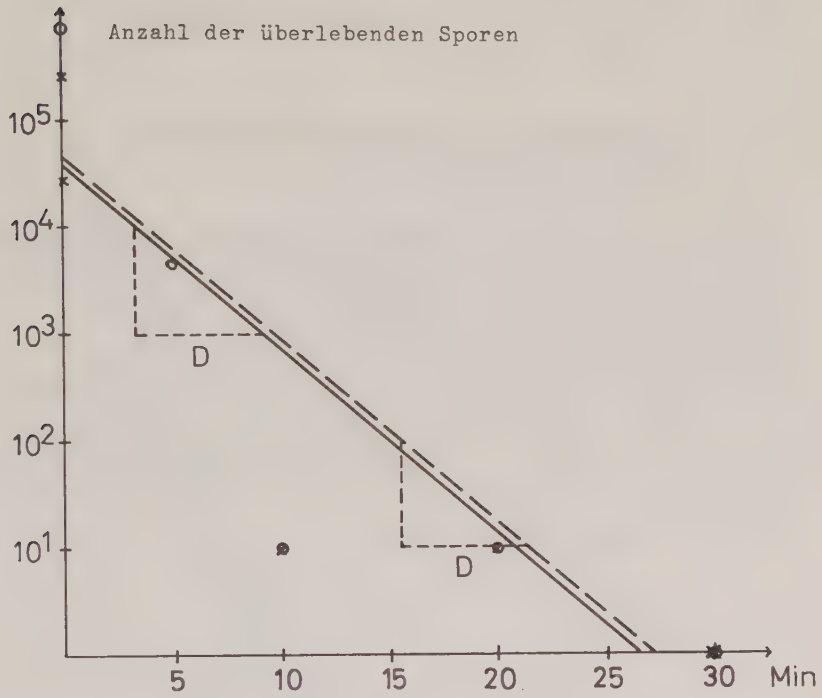
4.2.3 Leinenschnurstücke mit Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension beimpft

Nachdem die Schnurstücke 20 Minuten sterilisiert wurden, konnte auf dem Agar kein Wachstum mehr festgestellt werden. Da die Blutagarplatten nur mit 100 Mikroliter aus der Spülflüssigkeit beimpft wurden, wurden die Spülgefäße bebrütet. Nach 20 Minuten Sterilisierzeit zeigten sich noch überlebende Sporen. Erst nachdem die Schnurstücke 30 Minuten autoklaviert wurden, war kein Wachstum mehr nachzuweisen.
Der D-Wert betrug 5,76 Minuten.

4.2.4 Leinenschnurstücke mit angetrockneter Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension

Hier wurden, wie oben, nach 20 Minuten keine Keime mehr auf den Agarplatten gefunden. Auch für die endgültige Abtötungszeit ergab sich nach dem Bebrüten 30 Minuten. Der D-Wert betrug, ebenfalls wie oben, 5,76 Minuten.

Abtötungskurven für die mit Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension beimpften Leinenschnurstücke



Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420:
——— nicht angetrocknete Sporensuspension
– – – angetrocknete Sporensuspension

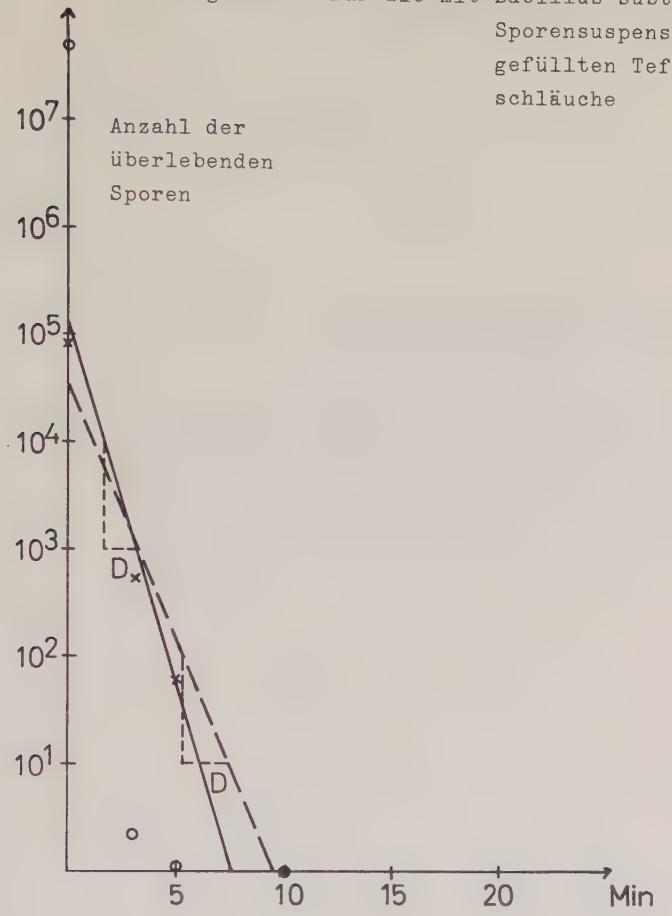
4.2.5 Teflonschläuche mit Bacillus subtilis-Sporensuspension gefüllt

Nach 10 Minuten Sterilisierzeit wurden keine Keime mehr auf den Agarplatten gefunden. Da die gesamte autoklavierte Sporensuspension auf den Agar gebracht wurde, entsprachen hier die 10 Minuten der endgültigen Abtötungszeit.
Der D-Wert betrug 1,49 Minuten.

4.2.6 Teflonschläuche mit angetrockneter Bacillus subtilis-Sporensuspension

Durch die hier angewandte Membranfiltermethode konnten alle überlebenden Sporen auf den Blutagarplatten erfaßt werden. Es fanden sich auf den Agarplatten im Durchschnitt 0,7 Keime nach 10 Minuten Sterilisierzeit. Da bei den Abtötungskurven der Logarithmus der Keimzahl verwandt wird, ergibt sich für 0,7 Keime ein negativer Ordinatenwert. Weil dies jedoch nicht sinnvoll wäre, entspricht die Sterilisierzeit von 10 Minuten der endgültigen Abtötungszeit der Sporen.
Der D-Wert betrug 2,09 Minuten.

Abtötungskurven für die mit Bacillus subtilis-Sporensuspension gefüllten Teflonschläuche



Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420:
——— nicht angetrocknete Sporensuspension
– – – angetrocknete Sporensuspension

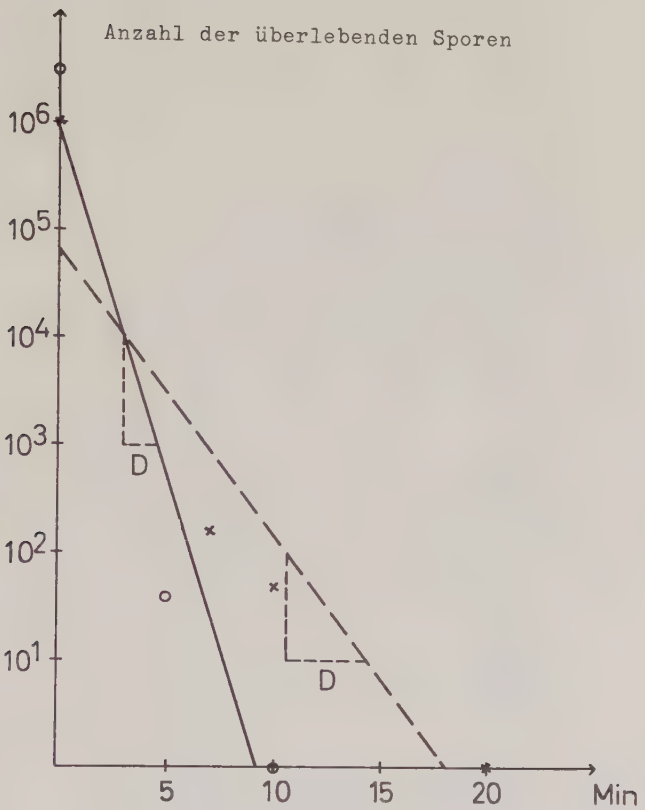
4.2.7 Leinenschnurstücke mit Bacillus subtilis-Sporensuspension beimpft

Nach 10 Minuten Autoklavieren wurden keine Keime mehr auf dem Agar gefunden. Auch nach dem Bebrüten mit Soja-Nährlösung konnten nach 10 Minuten Sterilisierzeit keine überlebenden Sporen mehr nachgewiesen werden.
Der D-Wert betrug 1,55 Minuten.

4.2.8 Leinenschnurstücke mit angetrockneter Bacillus subtilis-Sporensuspension

Nachdem die Schnurstücke 20 Minuten autoklaviert wurden, fanden sich keine Keime mehr auf den Agarplatten. Auch nach Bebrüten nach 20 Minuten Sterilisierzeit wurden keine überlebenden Sporen mehr gefunden.
Der D-Wert betrug 3,71 Minuten.

Abtötungskurven für die mit Bacillus subtilis-Sporensuspension beimpften Leinenschnurstücke



Sterilisierzeit im Autoklav Aesculap 420:
——— nicht angetrocknete Sporen
– – – angetrocknete Sporen

Ergebnisse der Sterilisation von Teflonschläuchen und Leinenschnurstücken im Autoklav Aesculap 420

I. Bacillus stearothermophilus

Versuchsobjekt	Abtötungszeit nach Auszählen des Agars	Abtötungszeit nach Bebrüten mit Nährlösung	D-Wert
Teflonschläuche mit Sporensuspension gefüllt	30 Minuten	keine Bebrütung erforderlich	4,9
Teflonschläuche mit angetrockneter Sporensuspension	20 Minuten	keine Bebrütung erforderlich	6,22
Leinenschnurstücke mit Sporensuspension beimpft	20 Minuten	30 Minuten	5,76
Leinenschnurstücke mit angetrockneter Sporensuspension	20 Minuten	30 Minuten	5,76

II. Bacillus subtilis

Versuchsobjekt	Abtötungszeit nach Auszählen des Agars	Abtötungszeit nach Bebrüten mit Nährlösung	D-Wert
Teflonschläuche mit Sporensuspension gefüllt	10 Minuten	keine Bebrütung erforderlich	1,49
Teflonschläuche mit angetrockneter Sporensuspension	10 Minuten	keine Bebrütung erforderlich	2,09
Leinenschnurstücke mit Sporensuspension beimpft	10 Minuten	10 Minuten	1,55
Leinenschnurstücke mit angetrockneter Sporensuspension	20 Minuten	20 Minuten	3,71

4.2.9 Vergleich der Versuche mit Teflonschläuchen und Leinenschnurstücken

1. Bacillus stearothermophilus

Der D-Wert für die in den Teflonschläuchen angetrockneten Bacillus stearothermophilus-Sporen war gegenüber den mit Sporensuspension gefüllten Schläuchen größer. Bei ersteren fand sich nach 20 Minuten und bei letzteren nach 30 Minuten kein Wachstum mehr auf den Blutagarplatten. Wenn man berücksichtigt, daß bei der angetrockneten Sporensuspension die Ausgangskeimzahl nur halb so groß war wie bei den mit Suspension gefüllten Schläuchen, dann ergibt sich die bekannte Tatsache, daß Sporen im trockenen Zustand resistenter sind als im feuchten Milieu.
Dies konnte bei den Versuchen mit den Leinenschnurstücken nicht gezeigt werden. Hier waren die D-Werte und die Sterilisierzeit gleich groß.
Im Vergleich zu den Teflonschläuchen war im feuchten Zustand der D-Wert bei den Leinenschnurstücken größer, nach dem Antrocknen jedoch kleiner. Die Abtötungszeiten lagen, mit der oben begründeten Ausnahme bei den Teflonschläuchen mit angetrockneter Sporensuspension, immer bei 30 Minuten. Die Teflonschläuche erschweren das Autoklavieren also nicht und sind mittels dem üblicherweise angewandten gesättigten Dampf von 121 Grad Celsius und 1 atü sterilisierbar.

2. Bacillus subtilis

Hier zeigte sich bei den autoklavierten Teflonschläuchen, daß der D-Wert für die in den Schläuchen angetrocknete Sporensuspension größer war als für die in die Schläuche gefüllte Suspension. Die Sterilisierzeit war gleich, was wiederum auf die erheblich kleinere Ausgangskeimzahl bei den angetrockneten Schläuchen zurückzuführen ist. Daraus ergibt sich ebenfalls, daß die angetrockneten Sporen

resistenter sind als die im feuchten Zustand autoklavierte Suspension.
Auch bei den Leinenschnurstücken ließ sich diese Tatsache bestätigen. Der D-Wert ist für die angetrockneten Sporen größer und die Sterilisierzeit länger als bei der sofort autoklavierten Sporensuspension.
Die D-Werte sind bei den Leinenschnur-Versuchen größer als bei den Versuchen mit den Schläuchen. Die Abtötungszeit ist bei der auf den Schnurstücken angetrockneten Bacillus subtilis-Sporensuspension länger als bei den nicht angetrockneten Sporen.
Auch hier erweist sich, daß die Teflonschläuche mit 30 Minuten einwirkendem Sattdampf von 121 Grad Celsius und 1 atü erfolgreich sterilisiert werden können.

3. Vergleich Bacillus stearothermophilus - Bacillus subtilis

Wenn man die D-Werte und die Abtötungszeiten miteinander vergleicht, zeigt sich, daß die Bacillus stearothermophilus-Sporensuspension deutlich resistenter ist als die Bacillus subtilis-Sporen.

5. Diskussion

Man kann nicht davon ausgehen, daß Wasserdampf Öl und Ölsuspensionen durchdringt (Perkins, 1969). Trotzdem lassen sich ölbedeckte Metallflächen autoklavieren. Die dabei gefundenen Abtötungszeiten von höchstens 35 Minuten sind sicher nicht ausreichend, um die Sterilisation dieser Metalloberflächen durch reine Hitzeeinwirkung von 120 Grad Celsius zu erklären. Es wurde zum Beispiel festgestellt, daß bei einer Temperatur von 160 Grad Celsius eine Zeitspanne von 160 Minuten erforderlich ist, um resistente Sporen in wasserfreiem Öl und Fett abzutöten (Perkins, 1969). Nichtsdestoweniger konnte bei unseren Versuchen der V_2A-Stahl mit ölbedeckten Sporen sterilisiert werden.
Eine Erklärung dafür wäre, daß das Öl einen zusammenhängenden Film über kleinen Kavitäten bildet, die Keime enthalten und auf diese Art und Weise ein begrenztes Eindringen von Wasserdampf ermöglicht wird (Hegna, Kardel K., Kardel M.).

Weiterhin wäre ein geringer Wassergehalt im Öl denkbar, wobei ja schon 0,1% Wasserzusatz genügen, um Fett, Öl und Paraffin in 30 Minuten bei 120 Grad Celsius im Autoklav zu sterilisieren (Rodenbeck, 1932).
Daß die Schichtdicke und die Viskosität des Öls die Sterilisation ebenfalls beeinflussen, ist sicherlich auf dessen geringe Wärmeleitfähigkeit zurückzuführen. Mit zunehmender Schichtdicke und Viskosität verringert sich die Wärmeleitung und somit erhöht sich die Schutzwirkung des die Sporen umgebenden Öls gegenüber dem Wasserdampf.
Um eine sichere Sterilisation von zum Beispiel im zahnärztlichen und chirurgischen Bereich benutzten rotierenden Instrumenten zu gewährleisten, ist es, aufgrund der sehr unterschiedlichen Bedingungen auch bei ähnlich gebauten Geräten, empfehlenswert, jedes Instrument und das dafür verwandte Schmieröl auf ihre Sterilisierbarkeit zu prüfen.

Bei den Versuchen mit den Teflonschläuchen stellt sich die Frage, wie der Dampf in die Schläuche gelangt. Das Teflon ist sicherlich nicht für den Dampf durchlässig, denn es bleibt bis 325 Grad Celsius fest. Außerdem besitzt es eine besondere Chemikalienbeständigkeit (Christen 1973). Es liegt daher nahe, daß sich bei den mit Sporensuspension gefüllten Schläuchen die Suspension durch Wärmeleitung erhitzt und durch den dadurch im Schlauch entstehenden Wasserdampf ein zwar durch die notwendige Erwärmung des schlecht wärmeleitenden Teflons und durch den Luftgehalt im Schlauch verzögerter, aber dennoch wirksamer Sterilisationsprozeß einstellt.
In die offenen Schläuche, in denen die Sporensuspension angetrocknet wurde, kann der Dampf ungehindert in das Schlauchlumen eindringen. Obwohl die Bedingungen für eine erfolgreiche Sterilisation hier also weitaus besser sind als bei den geschlossenen Schläuchen, waren die offenen Teflonschläuche schwerer zu autoklavieren, was darauf zurückzuführen ist, daß die angetrockneten Sporen resistenter gegen den Wasserdampf sind als die in der Suspension gelösten Sporen.

6. Zusammenfassung

Wir untersuchten, ob mit Bacillus stearothermophilus-Sporen bedeckte Metalloberflächen, die mit niedrig viskösem Aesculap Spezialöl GA 59 und hoch viskösem Paraffinöl beschichtet wurden, unter den üblichen Bedingungen sterilisiert werden können. Dazu wurden auf die Metallflächen Ölfilme von 0,033 Millimeter und 0,157 Millimeter Dicke aufgetragen, so daß, neben der Viskosität, auch der Einfluß der Schichtdicke auf den Sterilisationsvorgang geklärt wurde. Sterilisiert wurde mit dem Autoklav Aesculap 420, der nach dem Gravitationsverfahren arbeitet und mit dem Autoklav Optimat, bei dem ein Vorvakuum bis 0,93 at (0,91 bar) erzeugt wird. Die Metallplättchen und -teller wurden bei 121 Grad Celsius und 1 atü solange autoklaviert, bis sich auf Blutagarplatten und in Gambro-Nährlösung kein Wachstum mehr zeigte. Der Sterilisationsverlauf wurde in Überlebenskurven dargestellt und die D-Werte errechnet.
Nach 30 Minuten Sterilisationszeit im Optimat und nach 35 Minuten im Aesculap 420, waren keine überlebenden Sporen mehr nachzuweisen. Die üblicherweise angewandte Sterilisierzeit von 30 Minuten bei 121 Grad Celsius reicht also im Vorvakuumautoklav aus, um die Metalloberflächen, die mit zwei unterschiedlich dicken Ölfilmen aus Spezialöl GA 59 und Paraffinöl bedeckt wurden, zu sterilisieren, während beim Autoklav Aesculap 420 erst nach 35 Minuten sicher Keimfreiheit erreicht werden konnte.

Weiterhin wurden Teflonschläuche von 1 Millimeter lichtem Durchmesser und als Vergleich dazu Leinenschnurstücke im Autoklav Aesculap 420 sterilisiert, nachdem diese vorher mit Bacillus stearothermophilus- und Bacillus subtilis-Sporensuspension beimpft wurden. Nach dem Beimpfen wurde ein Teil der Versuchsobjekte

sofort bei 121 Grad Celsius und 1 atü autoklaviert, auf anderen Leinenschnurstücken wurde die Suspension 1 Stunde und in Teflonschläuchen 7 Tage angetrocknet, bevor sie sterilisiert wurden. Nach dem Autoklavieren wurden die Versuchsobjekte in Aqua dest. gespült. Aus der Spülflüssigkeit wurden Agarplatten beimpft. Außerdem wurde die Spülflüssigkeit mit Nährlösung versetzt und bebrütet. Es wurden Überlebenskurven und D-Werte berechnet. Es zeigte sich, daß Sporen im trockenen Zustand resistenter sind als im feuchten Milieu. Weiterhin ergab sich, daß die Teflonschläuche mit 30 Minuten einwirkendem gesättigtem Dampf von 121 Grad Celsius und 1 atü sterilisiert werden können.

7. Literaturverzeichnis

CHRISTEN, H. R.: Einführung in die Chemie
8. Auflage
Diesterweg Salle, Frankfurt a. M.,
Berlin, München 1973

HALLECK, F. E., S. MIZUBA, D. I. ZIMMER and J. WOODROW:
Criteria for determining steam sterilization cycles for lubricated and non-lubricated mechanical equipment
Medical Instrumentation 13, 168-171 (1979)

HEGNA, I., K. KARDEL and M. KARDEL:
Autoclaving of lubricated dental instruments
Scand. J. Dent. Res. 86, 130-134 (1978)

HORN, PRIVORA, WEUFFEN:
Handbuch der Desinfektion und Sterilisation
Band II, 40-63, 302
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1973

KONRICH, F.: Die bakterielle Keimtötung durch Wärme
2. Auflage, 141-143
Ferdinand Enke, Stuttgart 1963

PERKINS, J.: Principles and methods of sterilization in health sciences
Second Edition, 286-288
Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 1969

RODENBECK, H.: Über die thermische Sterilisation wasserfreier Stoffe und die Resistenz einiger Bakterien bei Erhitzung in solchen Stoffen
Archiv für Hygiene 109, 67-84 (1932)

WALLHÄUSSER, K. H.: Sterilisation - Desinfektion-
Konservierung
2. Auflage, 192-224
Thieme, Stuttgart 1978

Mein herzlicher Dank gilt:

meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. K. Botzenhart, für die Überlassung des Themas und für die freundliche Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen,

allen Freunden und Bekannten, insbesondere Frl. Buck und Frl. Ch. Großmann, sowie Herrn W. Salmansperger für die stete Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

LEBENSLAUF

Am 17. Oktober 1958 wurde ich, Rolf Wilfried Großmann, als Sohn des Mechanikers Helmut Großmann und der Schneiderin Rita Großmann, geborene Müller, in Grötzingen geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule von 1965 bis 1968, wechselte ich auf die Realschule in Wendlingen, wo ich am 20. Juni 1974 die Mittlere Reife machte. Vom Sommer 1974 bis 1977 besuchte ich dann das Robert-Bosch-Gymnasium in Wendlingen, wo ich am 3. Mai 1977 das Abitur ablegte.

Vom 1. Juli 1977 bis 30. September 1978 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Zum Wintersemester 1978/79 erfolgte die Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen für das Studienfach Zahnmedizin. Am 9. Oktober 1979 bestand ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Am 16. März 1981 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung in Tübingen ab. Im Sommersemester 1981 begann für mich der klinische Abschnitt meines Studiums, den ich am 6. Dezember 1983 mit dem Staatsexamen abschloß. Die Approbation als Zahnarzt wurde mir zum 13. Dezember 1983 ausgesprochen.

Am 1. März 1984 nahm ich die Tätigkeit als Zahnarzt auf.